



(51) Int Cl5:
C12P 7/62

PI 9103116 A

(11) (21)

(22) Data de Depósito: 16/07/91

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(43) Data de Publicação: 24/02/93 (RPI 1160)

I N P I
C E D I N
DOCUMENTO ORIGINAL
BANCO DE PATENTES

(54) Título: Processo para produzir polihidroxialcanoatos a partir de açúcares extraídos da cana-de-açúcar

(71) Depositante(s): Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT (BR/SP)

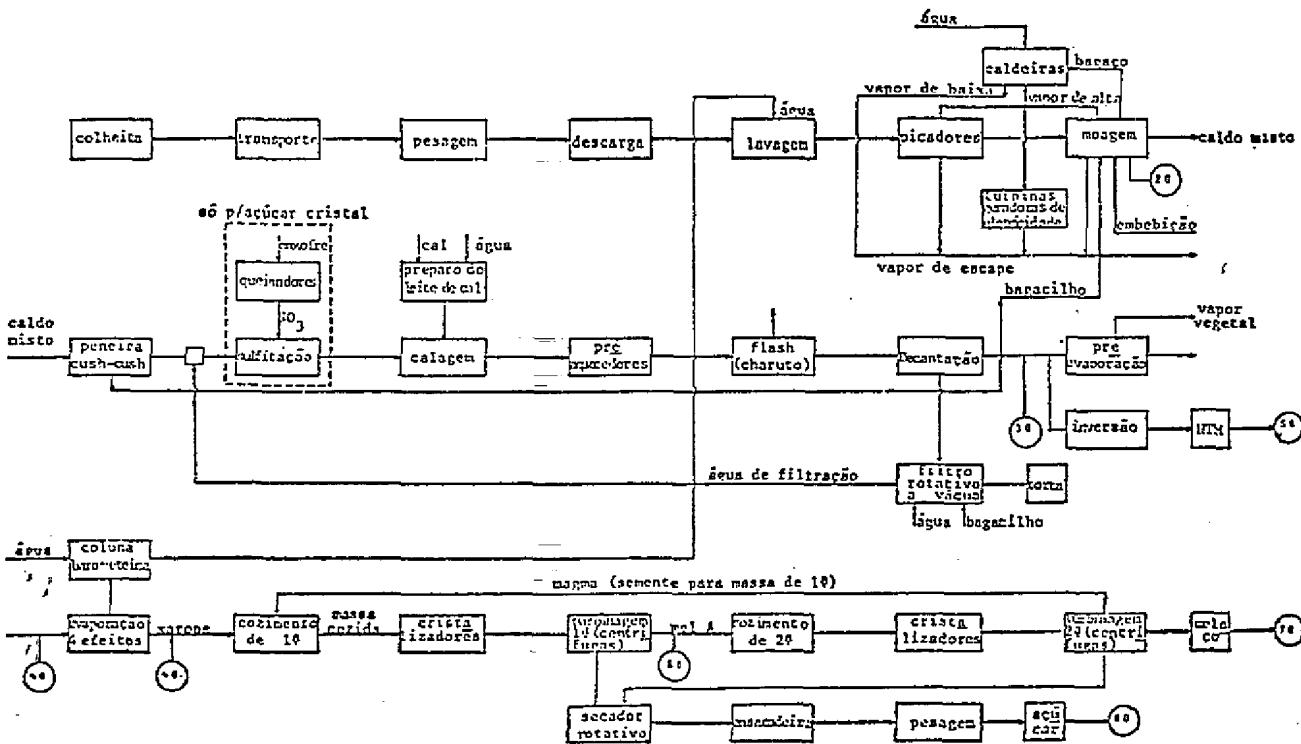
(72) Inventor(es): Celso Lellis Bueno Netto; Américo Martins Craveiro; José Geraldo da Cruz Pradella; Margaretti Simões Oliveira; Alfredo Eduardo Maiorano; Arménio Gomes Pinto; Rosa Mitiko Saito Matsubara

(74) Procurador: Antonio Fernando Pressinotti

(57) Resumo: Esta invenção trata de um processo de produção de polihidroxialcanoatos, designados genericamente com PHA, obtidos por fermentação submersa onde a principal, mas não única, fonte de carbono é constituída por açúcares extraídos da cana-de-açúcar em sua forma bruta como caldo, ou processada, como méis, charopes, melações ou cristais com diversos graus de pureza que contenham misturas de sacarose, glicose e frutose em qualquer proporção. O processo de extração e preparo do mosto de

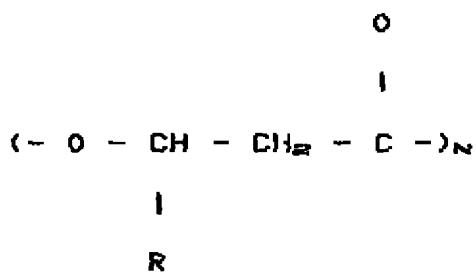
fermentação para a produção de polihidroxialcanoatos deve estar, preferencialmente, associado a uma unidade de produção de açúcar e álcool da qual recebe não apenas a matéria-prima, mas também, toda energia e demais utilidades necessárias. Os agentes biológicos responsáveis pela transformação destes açúcares em polihidroxialcanoatos são microorganismos procarióticos especialmente bactérias gram negativas usualmente solos naturais preferencialmente pertencentes ao gênero *Alcaligenes*. O processo de fermentação é caracterizado pela existência de duas fases; uma primeira fase onde se emprega um meio rico em açúcares e nutrientes próprio para o crescimento das bactérias e uma segunda fase onde o meio deve apresentar uma carência nutricional preferencialmente em fontes de nitrogênio, capaz de direcionar o metabolismo das bactérias para a síntese e acúmulo de polihidroxialcanoatos. Nesta segunda fase além dos açúcares, devem estar presentes no meio de cultura outras fontes de carbono que atuem como precursores de polihidroxialcanoatos diferentes do polihidroxibutirato resultando, preferencialmente, na síntese do copolímero polihidroxibutirato/polihidroxivalerato. O processo de separação e purificação dos grânulos de polihidroxialcanoatos é baseado no uso combinado ou independente de solventes, não solventes, agentes surfactantes e preparados enzimáticos. As operações de separação e purificação podem ser precedidas pelo rompimento mecânico das células de bactérias e seguidas por uma operação de secagem dos grânulos.

FIG. 1



RELATÓRIO DESCrittIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO "PROCESSO
PARA PRODUZIR POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE AÇUCARES
EXTRAÍDOS DA CANA DE AÇÚCAR"

São várias as linhagens de bactérias
5 que, em condições não balanceadas de crescimento, acumulam substâncias de reserva produzidas a partir do consumo e transformação de açúcares. Entre estas substâncias encontra-se uma família de poliésteres alifáticos, genericamente designados por
10 polihidroxialcanoatos, que são acumulados pelos microrganismos sob a forma de inclusões intracelulares. Estes poliésteres, insolúveis em água, apresentam a repetição da seguinte estrutura:



onde: R = grupo n-alquil de comprimento variável

15 R = metil, hidroxibutirato (HB)
R = etil, hidroxivalerato (HV)
R = propil, hidroxicaproato (HC)
R = butil, hidroxihexanoato (HH)

39103116

9103116

R : pentil, hidroxioctanoato (HO)

Entre estes compostos, o

polihidroxibutirato (PHB) identificado pela primeira vez em 1926 por Lemoigne no Instituto Pasteur em Paris, é aquele preferencialmente sintetizado por um grande número de linhagens de bactérias sendo que o seu teor em relação ao peso seco das bactérias pode atingir de 10 a 90%. O polímero microbiano PHB, assim como alguns de seus copolímeros, por exemplo PHB/PHV (Polihidroxibutirato - Co-hidroxivalerato), apresentam características termoplásticas equivalentes as encontradas em resinas convencionais normalmente empregadas na fabricação de materiais plásticos via extrusão, sopro ou moldagem. Estes polímeros microbianos também apresentam outras características como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade além de propriedades piezoeletricas. Estas características permitem aplicações em áreas como a fabricação de produtos médico-cirúrgicos como próteses e fios de sutura, encapsuladores para liberação lenta de medicamentos, biocidas e adubos, embalagens descartáveis, coberturas para o plantio de produtos agrícolas em regiões de clima frio, dispositivos para estimulação muscular, etc. Estas diferentes aplicações potenciais dos polihidroxialcanoatos dependem do grau de pureza do produto, do peso molecular do polímero, da presença e do teor de copolímeros que podem alterar as propriedades físicas e químicas dos produtos. Em

29/10/03 11
91031

qualquer caso, o produto é constituído preferencialmente pelo polihidroxibutirato cujo teor pode variar de 100 a 70% do peso total do homopolímero ou copolímero sintetizado. O peso molecular médio dos polímeros sintetizados deve ser superior a $5 \cdot 10^6$, preferencialmente superior a 10^7 .

As bactérias capazes de sintetizar os polihidroxialcanoatos pertencem a diferentes grupos taxonómicos como as do gêneros: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Rhodospirulum*, *Alcaligenes* e *Azotobacter* utilizando diferentes substratos como fonte de carbono. Particularmente, *Alcaligenes entrophus* (nut glic +), *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudophava*, *Pseudomonas cepacia* e *Micrococcus halodenitrificans* são capazes de sintetizar PHA a partir de glicose e, em alguns casos, a partir de frutose. Algumas linhagens de *Alcaligenes latus* sintetizam PHA a partir de sacarose.

O metabolismo que leva a síntese de PHB (o principal dos polihidroxialcanoatos) apresenta um mecanismo de regulação controlado pela enzima acetyl-CoA aciltransferase que é inibida por concentrações elevadas de coenzima A. Em condições balanceadas de cultivo os níveis de CoASH são altos e a síntese de PHB é inibida. Nestas condições não há interferências na cadeia respiratória e as células obtém energia e sintetizam material celular (crescimento). Quando há limitação nutricional e um excesso de carbono no meio, a síntese de NADH inibe a enzima citrato sintetase e o nível de

29100311
91031

acetil-CoA aumenta até eliminar a inibição pela CoASH. Assim, a reação de condensação que leva a aceto acetil-CoA se torna possível e a síntese de PHB passa a ocorrer. Por um processo metabólico correlato a presença de outras fontes de carbono no meio podem levar a síntese de copolímeros do PHB, sendo que o caso de maior interesse consiste na presença de precursores do polihidroxivalerato no meio de cultura levando à síntese do copolímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB/PHV).

A partir destas características metabólicas pode-se conceber um processo fermentativo que deve ocorrer em duas fases. Em uma primeira fase deve-se favorecer o crescimento celular empregando-se um meio de cultivo balanceado e atingir concentrações celulares as mais altas possíveis. Na segunda fase deve-se impor uma limitação nutricional, geralmente uma carência em fontes de nitrogênio ou fósforo ou oxigênio, de forma a direcionar o metabolismo das bactérias para a síntese de PHB. É também nesta segunda fase, a fase de acúmulo, que eventualmente podem ser adicionados outras fontes de carbono, além dos açúcares, resultando na síntese de copolímeros do PHB, como por exemplo o PHB/PHV.

A invenção, objeto desta patente, tem seu início no processamento da cana-de-açúcar nas usinas convencionais de açúcar e de álcool que fornecem à Unidade Produtora de Polihidroxialcanoatos (PHA) a

2910011
91031

- matéria prima tratada para preparo do mosto de fermentação, assim como todas as utilidades necessárias ao processo, tais como: vapor, água, eletricidade, ar comprimido e outras.

2910011:
9103115

homogeneizadores de alta pressão (7) que promovem o rompimento das células que são então transferidas para os tanques de extração (8) e purificação (9) de PHA onde se usam solventes e/ou preparados enzimáticos e/ou agentes surfactantes e/ou não solventes; as operações de extração e purificação podem ser realizadas em pelo menos 2 etapas, eventualmente intermediadas pelas operações de lavagem e concentração em separadores mecânicos (10); estas mesmas operações (lavagem e concentração) podem ser realizadas em separadores (11) após as etapas de extração e purificação ou antes da operação final de secagem dos grânulos de PHA em equipamentos de secagem como spray-driers a ciclones (12), ou outro conveniente; nos tanques (2), (3), (4), (8) e (9) a temperatura é controlada pela recirculação externa do conteúdo dos tanques, através dos trocadores de calor (13), (14), (15), (16) e (17), também o ar usado na secagem do produto é aquecido por um trocador de calor (18). O oxigênio necessário para o metabolismo bacteriano é injetado nos tanques (2), (3) e (4) sob a forma de ar comprimido; sendo que, de forma genérica, os fluidos são transportados por bombeamento e tanques pulmões podem eventualmente ser acrescentados ao processo.

As operações para extração e preparo do mosto de fermentação são aquelas usualmente praticadas nas usinas produtoras de álcool etílico a partir de cana-de-acúcar. A cana colhida é armazenada

29100111

9103116

pelo menor tempo possível em barracões no interior das usinas. Em seguida, a cana é transportada para as mesas de lavagens onde se banha a cana com agua quente. A cana lavada é então processada em picadores e desfibradores e transportada para as moendas ou difusores onde ocorre a extração do caldo denominado caldo misto com uma concentração de ART (acucares redutores totais) compreendida entre 12 e 18%. Na sequência, o caldo passa por um processo de clarificação onde ele é peneirado, sulfitado (no caso de fabricação de açúcar cristal), tratado com cal, aquecido a 105°C, fashedado e finalmente decantado por exemplo em decantadores do tipo "Door". O caldo clarificado apresenta uma concentração de açúcares equivalente a do caldo misto. Em seguida inicia-se a etapa de concentração do caldo em evaporadores a vácuo resultando em um xarope cuja concentração em ART é superior a 50%. Esta operação pode ser precedida por um processo de hidrolise (inversão parcial) do caldo resultando em uma solução de sacarose, glicose e frutose em proporções variadas que após a concentração resulta em um xarope concentrado e invertido (High Test Molasses - HTM) cuja concentração em ART é superior a 50%. O xarope concentrado é então cozido, cristalizado e centrifugado (em duas etapas consecutivas) gerando os cristais de açúcar que em seguida são secos e embalados. Toda a energia necessária para a produção dos polihidroxialcanoatos provém do vapor gerado pela queima do bagaço de cana-de-açúcar de

2910011:
6/03/15

acordo com a prática corrente em usinas de açúcar e álcool; alternativamente, pode-se utilizar outras fontes de energia que possam substituir o vapor gerado pela queima do bagaço de cana-de-açúcar.

5 O diagrama da figura 1 ilustra o processo a partir do qual a matéria-prima para fabricação de polihidroxialcanoatos é extraída e preparada e de onde provêm o fornecimento de utilidades. A figura 2 apresenta o fluxograma da unidade de produção 10 de PHA que, como dito anteriormente deve, preferencialmente, estar acoplada a uma unidade de produção de açúcar e álcool.

15 O mosto utilizado para o cultivo das bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos deve ser preparado segundo o exposto acima. A coleta do material empregado para o preparo do mosto de fermentação pode se 20 dar nos seguintes pontos do processo de fabricação de açúcar e álcool (ver diagrama da figura 1).

- 25 . Caldo misto (20): coletado diretamente após a moagem contendo 12% de açúcares redutores totais (ART) ou mais.
- . Caldo clarificado(30): coletado após a calagem, aquecimento e decantação, contendo 12% de açúcares redutores totais ART ou mais.
- 30 . Xarope concentrado (40), coletado após a concentração em evaporadores a vácuo contendo 50% de açúcares redutores totais (ART) ou mais.

39100116
9103116

- Xarope concentrado e invertido (50) (High Test Molasses - HTM), coletado após a hidrólise e concentração contendo 50% de açúcares redutores totais (ART) ou mais, sendo que o teor em glicose é no mínimo de 30% do teor total de açúcares.
- Mel de primeira ou mel A (60): coletado após a primeira etapa de cristalização do açúcar, contendo 50% de açúcares redutores totais (ART) ou mais.
- Mel final ou melado (70): efluente da última etapa de cristalização contendo 50% de açúcares redutores totais (ART) ou mais.
- Açúcar cristalizado bruto (80): por exemplo do tipo cristal ou demerara.

Em qualquer caso, seja com o uso de apenas um destes materiais ou de uma mistura de dois ou mais deles em qualquer proporção, deve-se proceder a uma diluição com água, de forma a se assegurar uma concentração de ART compreendida na faixa de 10 a 60g/l. Esta diluição pode ser efetuada antes ou durante a alimentação das dornas de fermentação (2), (3) e (4). Durante a fase de crescimento celular o teor de amônia no meio deve estar preferencialmente na proporção, em peso, de uma parte de sulfato de amônio para três partes de açúcares.

Durante a fermentação o pH deve se situar em torno de 7 e a temperatura na faixa de 28 a 36 °C e a concentração de oxigênio dissolvido deve estar entre 10 e 60% da saturação. O mosto deve ser inoculado

29100116
9103116

com bactérias, previamente cultivadas em pré-fermentadores (2), de forma que a concentração inicial de células se situe na faixa de 0,1 g/l a 3g/l em base seca. Estas bactérias devem pertencer aos gêneros citados anteriormente, preferencialmente ao gênero *Alcaligenes* e as espécies *eutrophus* ou *latus*. Estas espécies podem se apresentar na forma de cultura pura ou mista em qualquer proporção.

Uma vez iniciado o processo as bactérias consomem os substratos limitantes, açúcares e amônia, os quais devem estar próximos da exaustão após 15h, podendo se estender até 20h ou se antecipar para 10h. Neste momento quando o meio de cultivo estiver próximo da exaustão, definida como uma concentração de açúcares inferior a 5g/l, o tanque de fermentação (3) deve ser recarregado com açúcares e amônia de forma a se recuperar a condição inicial onde a concentração média de açúcar era de 30g/l na proporção de 3:1 com relação ao sulfato de amônio em base massica.

Novamente deve se esperar que a concentração dos substratos limitantes se aproximem da exaustão definida como anteriormente. Esta segunda exaustão pode ocorrer 20 ou até 60 horas após o início do processo preferencialmente em torno de 30 horas. Estas operações definem a primeira fase do processo, a fase de crescimento celular, podendo ser conduzida em duas etapas como o descrito acima, ou então em uma só etapa.

291003116
9103116

A alimentação dos tanques de fermentação (2), (3) e (4), assim como a inoculação com as bactérias citadas, pode se dar com vazões tão altas quanto possível fazendo com que o crescimento das bactérias ocorra com o volume útil dos fermentadores (2), (3) e (4) totalmente ocupados caracterizando um processo descontínuo (batch) de fermentação. Alternativamente, pode-se também proceder a uma alimentação gradual dos tanques de fermentação (2), (3) e (4) de forma que a multiplicação das bactérias ocorra durante o enchimento dos tanques (2), (3) e (4), caracterizando um processo descontínuo alimentado (fed-batch) de fermentação.

Em qualquer caso, ao final da fase de crescimento, a concentração final de bactérias deve ser superior a 10g/l preferencialmente na faixa de 20 a 40 g/l com um teor de Polihidroxialcanoatos da ordem de 10% no caso da linhagem de bactéria empregada ser *Alcaligenes entrophus* e superior a 20% quando a linhagem for *Alcaligenes latus*.

Em seguida, dá-se início a segunda fase da fermentação, onde ocorre a acumulação dos Polihidroxialcanoatos. Nesta fase a alimentação do tanque de fermentação (4) também é constituída principalmente por açúcares da cana-de-açúcar, sacarose, glicose e frutose sob a forma de soluções obtidas a partir da diluição dos caldos, xaropes, méis e cristais coletados no processo de fabricação de açúcar e álcool.

39103116
9103116

de maneira isolada ou sob a forma de mistura destes substratos em qualquer proporção. Em qualquer caso, a alimentação do mosto deve ser tal que assegure uma concentração de açúcares no tanque de fermentação (4) ao longo de toda a fase de acúmulo superior a 5g/l, mas não superior a 50 g/l. Nesta fase o mosto deve ser pobre em amônia que deve estar presente em concentrações inferiores a 0,1% em massa mas, por outro lado, o mosto pode ser suplementado com ácido propiônico, ou subprodutos da fermentação alcoólica como o óleo fusel, ácido pentanoico ácido propiônico ou qualquer outro produto que atue como precursor dos polihidroxialcanoatos diferentes do polihidroxibutirato, preferencialmente o polihidroxivalerato.

A proporção entre o teor de açúcares e o teor de precursores na alimentação da fase de acúmulo deve ser de uma (1) parte de precursor para duas (2) partes de açúcares em massa podendo em outros casos atingir proporção de até uma (1) parte de precursor para até dez (10) partes de açúcares. Todas as outras condições desta fase da fermentação devem ser iguais as da primeira fase.

A segunda fase da fermentação, fase de acúmulo, deve ter uma duração de 20h podendo se estender até 40h ou se completar em 10h. O final desta fase é indicado pela queda da velocidade de acúmulo dos polihidroxialcanoatos identificada pela estabilização da concentração total de bactérias expressa em aramas de

39100116
9103116

matéria seca total por litro (g/l), que deve ser superior a 10g/l, preferencialmente superior a 20 g/l apresentando um teor em massa de polihidroxialcanoatos superior a 30% preferencialmente superior a 60%. No caso da síntese de um copolímero do polihidroxibutirato, em consequência do uso de precursores na composição do mosto empregado na fase de acúmulo, o polihidroxialcanoato diferente do polihidroxibutirato deve representar de 2 a 30% da massa total de polímeros formados.

Para cada quilo de polímero formado são consumidos no máximo 6kg de açúcares, sendo que preferencialmente devem ser consumidos 3kg de açucares ou menos. Em média, cada metro cúbico de fermentador, em geral, deve produzir, em uma hora, cinqüenta gramas de polímeros, sendo que em casos melhores, cada metro cúbico de fermentador deve apresentar uma produção média horária superior a 100 g de polímeros.

As duas fases da fermentação podem ser conduzidas em um mesmo tanque (3) ou em tanques diferentes (3) e (4), caso em que ao final da primeira fase, a fase de crescimento, se procede à concentração das células de bactérias através de uma operação de centrifugação ou filtração em separadores (5) resultando em um volume de operação da fase de acúmulo igual à metade do empregado na fase de crescimento, ou preferencialmente da ordem de 10% do volume da fase inicial.

29100116
9103116

Durante as duas fases da fermentação, a fase de crescimento e a fase de acumulo, deve ser injetado ar comprido nos tanques de fermentação (2), (3) e (4) de forma a assegurar o fornecimento de oxigénio para o metabolismo das bactérias. As vazões de ar empregadas devem ser superiores a 0,1 v/v/m (volume de ar injetado/volume de mosto/minuto) e inferiores a 2v/v/m.

Os tanques de fermentação (2), (3) e (4) podem apresentar uma relação de diâmetro: altura (D:H) de 1:1 ou até 1:15. A agitação do mosto pode ser assegurada pelo uso de pás movidas a motores elétricos ou, simplesmente, resultar da injeção do ar comprimido nos tanques cuja pressão absoluta deve estar compreendida na faixa de 1 a 4 atmosferas.

Ao final da fermentação o meio contendo a suspensão de bactérias deve ser aquecido até uma temperatura superior a 80°C e inferior a 140°C através da injeção direta de vapor no tanque (4) em que se encontra a suspensão ou através da passagem da suspensão por trocadores de calor (15). O tempo de aquecimento pode variar de 1 minuto a 3 horas. O objetivo desta operação é a desnaturação dos ácidos nucleicos que provoca a inativação das bactérias e dificulta o aumento da viscosidade do meio após a lise (rompimento) celular que pode, eventualmente, ser obtida através do processamento da suspensão bacteriana em

29103116
9103116

equipamentos convencionais como homogeneizadores de alta pressão (7).

O processo de extração e purificação dos polihidroxialcanoatos utiliza solventes específicos e consiste em uma extração da massa celular com solventes que solubilizam os polímeros seguida de precipitação do poliéster por uma agente insolubilizante ("salting-out") miscível ao meio. Processos mecânicos de remoção de resíduos celulares e dos polímeros, podem ser efetuados através do uso de separadores mecânicos tais como centrifugas ou filtros (6), (10) e (11).

Os principais solventes que podem ser empregados para extração de PHA são a piridina; os carbonatos cíclicos; os hidrocarbonetos parcialmente halogenados como o clorofórmio; o diclorometano; o 1,1-dicloroetano; o 1,1,2-tricloroetano; o 1,1,2,2-tetracloroetano; o 1,2,3-tricloropropano e o cloreto de metileno. O peso do solvente de extração é, de preferência, 10 a 100 vezes superiores ao peso das células secas. A quantidade de solvente deve ser tal que a concentração da solução extraída contenha de 0,5 a 20% de PHB em peso. A recuperação dos polihidroxialcanoatos pode ser obtida por evaporação direta do solvente, seguida pela precipitação do polímero através do uso de um agente insolubilizante ("salting-out") miscível ao meio. Os não-solventes adequados à precipitação dos polímeros incluem misturas metanol/água, etanol, acetona, metil-etyl-cetona, hexano

291003116

9103116

ou éter de petróleo entre outros. Uma vez separados por decantação, filtração ou centrifugação, os grânulos poliméricos podem passar por lavagens sucessivas com metanol ou acetona ou qualquer outro produto conveniente, a fim de serem purificados. Os solventes e não-solventes são reciclados no processo após um processo de destilação convencional de onde se elimina água e eventuais contaminantes.

Alternativamente, os polihidroxialcanoatos podem ser extraídos e purificados por um processo enzimático. A suspensão de bactérias é adicionada uma mistura de enzimas comerciais, tais como proteases bacterianas ou fúngicas, papaína, bromelina, pepsina, lipases, fosfolipases, lisozima, enzimas líticas ou qualquer outro preparado enzimático, em qualquer proporção, capaz de digerir e solubilizar parte ou o todo do material celular a menos dos polihidroxialcanoatos, em uma ou mais etapas consecutivas. O preparado enzimático deve ser adicionado à suspensão de bactérias na proporção de 0,1 parte em massa de preparado para 100 partes de suspensão, podendo em alguns casos apresentar uma proporção massíca de até 10 partes de preparado para 100 partes de suspensão. O preparado enzimático deve permanecer em contato com a suspensão de bactérias por um período maior que uma hora e inferior a 10 horas a uma temperatura compreendida na faixa de 30 a 80°C. A digestão enzimática do material celular pode ser precedida ou procedida de uma etapa de

29103116

9103116

tratamento com um agente surfactante, como por exemplo dodecil sulfato de sódio, ou até mesmo realizar conjuntamente um tratamento enzimático/surfactante. Para algumas utilizações dos polialcanoatos o tratamento pode ser feito apenas com o surfactante em condições equivalentes àquelas empregadas no processo de purificação enzimático.

Em alguns casos os polihidroxialcanoatos PHA podem ser extraídos do produto da digestão enzimática por solubilização por solventes, conforme mencionado anteriormente, seguido de operações mecânicas de separação de sólidos, como filtração ou centrifugação.

Em outros casos os polihidroxialcanoatos PHA podem ser extraídos, iniciando-se as operações com uma etapa de tratamento com solventes, como mencionado anteriormente, e separando-se o material insolúvel por filtração ou decantação. O produto é então tratado com um preparado enzimático e/ou com agentes surfactantes, como mencionado anteriormente.

Qualquer que seja o processo empregado para a extração e purificação dos PHA devem ser utilizados pelo menos dois tanques agitados (8) e (9) com temperatura controlada através da recirculação externa do fluido em trocadores de calor (16) e (17).

Finalmente os grânulos de polímeros de PHA preferencialmente do copolímero PHB/PHV são secos

29103116
....
9 1 0 3 1 1 6

em equipamentos convencionais como spray-driers ou ciclones (12).

29103116

9103116

REIVINDICAÇÕES

1. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", caracterizado por a cana-de-açúcar ser processada em unidades convencionais de produção de açúcar e álcool que fornecem a Unidade Produtora de Polihidroxialcanoatos (PHA) a matéria prima tratada para preparo do mosto de fermentação, assim como todas as utilidades necessárias ao processo, tais como: vapor, água, eletricidade, ar comprimido e outras; alternativamente, pode-se adquirir matérias primas açucaradas para o mosto de fermentação no mercado fornecedor bem como a própria Unidade Produtora de Polihidroxialcanoatos pode prover as utilidades necessárias; a matéria prima é armazenada em um tanque (1) pulmão de onde é transferida para os fermentadores (2), (3) e (4) que também recebem água para o acerto da concentração inicial dos açúcares no mosto de fermentação; as bactérias produtoras de PHA são previamente cultivadas em um tanque (2) de preparo de inóculo de onde são transferidas para o fermentador (3) onde emprega-se um mosto rico em nutrientes cuja

39103116

9103116

formulação é própria para o crescimento celular; terminada esta fase a suspensão bacteriana pode ser concentrada através de separadores (5) e transferidos para o fermentador (4) onde ocorre a fase de acúmulo de PHA resultante do empobrecimento do meio de cultura em nutrientes (fontes de nitrogênio) ainda na fase de acúmulo, devem ser adicionados precursores de PHA diferentes do PHB, preferencialmente o PHV, de forma a se obter o copolímero PHB/PHV; terminada a fermentação a suspensão bacteriana é aquecida e depois lavada com água e re-concentrada em separadores (6); em seguida a suspensão pode, eventualmente, ser processada em homogeneizadores de alta pressão (7) que promovem o rompimento das células que são então transferidas para os tanques de extração (8) e purificação (9) de PHA onde se usam solventes e/ou preparados enzimáticos e/ou agentes surfatantes e/ou não solventes; as operações de extração e purificação podem ser realizadas em 2 etapas, eventualmente intermediadas pelas operações de lavagem e concentração em separadores mecânicos (10); estas mesmas operações (lavagem e concentração) podem ser realizadas em separadores (11) após as etapas de extração e purificação e antes da operação final de secagem dos grânulos de PHA em equipamentos de secagem como spray-driers e ciclones (12), ou outro conveniente; nos tanques (2), (3), (4), (8) e (9) a temperatura é controlada pela recirculação externa do conteúdo dos tanques, através dos trocadores de calor (13). (14).

39103116
9103110

(15), (16) e (17), também o ar usado na secagem do produto é aquecido por um trocador de calor (18); o oxigênio necessário para o metabolismo bacteriano é injetado nos tanques (2), (3) e (4) sob a forma de ar comprimido; sendo que de forma genérica, os fluidos são transportados por bombeamento e tanques pulmões podem eventualmente ser acrescentados ao processo.

2. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar o mosto de fermentação a partir dos seguintes componentes açucarados extraídos do processo de fabricação de açúcar e álcool, que citamos como exemplos não-limitantes: caldo misto, caldo clarificado, xarope concentrado, xarope concentrado e invertido, mel de primeira, mel final ou melaco e açúcar cristalizado bruto; que contenham misturas de sacarose, glicose e frutose em qualquer proporção.

3. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar um ou mais componentes açucarados extraídos do processo de fabricação de açúcar e álcool, em qualquer proporção, e proceder-se a uma diluição com água, a fim de se obter uma concentração de ART (açúcares redutores totais) compreendida na faixa de 10 a 60 g/l. sendo que esta

29103116

9103116

diluição pode ser efetuada antes ou durante a alimentação das dornas de fermentação (2), (3) e (4) e, durante a fase de crescimento celular, o teor de amônia no meio esteja, preferencialmente, na proporção, em peso, de uma parte de sulfato de amônio para três partes de açúcares.

4. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcar", de acordo com as reivindicações 1, caracterizado por manter durante a fermentação, o pH em torno de 7 e a temperatura na faixa de 28 a 36°C, sendo que a concentração de oxigênio dissolvido deve estar entre 10 a 60% da saturação; o mosto é inoculado com bactérias, previamente cultivadas em pré-fermentadores (2), sendo a concentração inicial de células situada na faixa de 0,1 g/l a 3,0 g/l em base seca, além do que, as bactérias devem, preferencialmente pertencer ao gênero *Alcaligenes* e as espécies *eutrophus* ou *latus*, podendo se apresentar na forma de cultura pura ou mista em qualquer proporção.

5. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, na fase de crescimento, os substratos limitantes, açúcares e amônia, deverem estar próximos da exaustão após 15 h, podendo se estender até 20 h ou se antecipar para 10 h, sendo que quando o cultivo estiver próximo da exaustão, definida como uma concentração de açúcares inferior a 5

29103116
9103116

g/l, o tanque de fermentação (3) deverá ser recarregado com açúcares e amônia de forma a se recuperar a condição inicial.

6. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, ainda na fase de crescimento, existirem, eventualmente, duas etapas consecutivas sendo que a segunda exaustão pode ocorrer 20 h ou até 60 h após o início do processo, preferencialmente em torno de 30 h.

7. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana de Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a alimentação do tanque de fermentação (2), (3) e (4), bem como a inoculação com as bactérias poderem se dar em vazões tão altas quanto possível, fazendo com que o crescimento das bactérias ocorra com o volume útil dos fermentadores (2), (3) e (4) totalmente ocupado, caracterizando um processo descontínuo (batch), ou também proceder a uma alimentação gradual dos tanques de fermentação (2), (3) e (4) de forma que a multiplicação das bactérias ocorra durante o enchimento dos tanques (2), (3) e (4), caracterizando um processo descontínuo alimentado (fed-batch) de fermentação; qualquer que seja o caso, ao final desta fase de crescimento, a concentração final de bactérias deve ser superior a 10 g/l. preferencialmente

291003116

9103116

na faixa de 20 a 40 g/l com um teor de polihidroxialcanoato da ordem de 10% no caso de linhagem empregada ser **Alcaligenes entophus** e superior a 20% quando a linhagem for **Alcaligenes latus**.

8. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se realizar a fase de acúmulo de polihidroxialcanoatos (2ª fase da fermentação), onde a alimentação do tanque de fermentação (4) também é constituída por açúcares extraídos da cana-de-açúcar, isoladamente ou em misturas em quaisquer proporções de tal forma que a alimentação do mosto assegure uma concentração de açúcares no tanque de fermentação (4) ao longo de toda a fase de acúmulo superior a 5g/l mas não superior a 50 g/l, sendo que a amônia deve estar presente em concentrações inferiores a 0,1% em massa; o mosto deve ser suplementado com ácido propiônico, ou subprodutos de fermentação alcóolica, como óleo fusel, ácido pentânico ou qualquer outro produto que atue como precursor dos polihidroxialcanoatos diferentes do polihidroxitubirato (PHB), preferencialmente o polihidroxivalerato (PHV).

9. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por uma proporção entre o teor de açúcares e o teor de precursores na alimentação

39103116
9103116

da fase de acúmulo ser, aproximadamente, de 1 parte de precursor para 2 partes de açúcares em massa, podendo em outros casos atingir proporções de até 1 parte de precursor para até 10 partes de açúcares, sendo que, todas as outras condições desta fase de fermentação devem ser equivalentes as da primeira fase (pH, temperatura, e outras).

10. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizada a segunda fase de fermentação, fase de acúmulo, com uma duração de 20 h podendo de estender até 40 h ou se completar em 10 h, sendo que o final desta fase é indicado pela queda de velocidade de síntese dos polihidroxialcanoatos identificada pela estabilização da concentração total de bactérias expressa em grama de matéria seca total por litro (g/l), que deve ser superior a 10 g/l, preferencialmente superior a 20 g/l apresentando um teor em massa de polihidroxialcanoatos superior a 30%, preferencialmente superior a 60%, além do que no caso de síntese de um copolímero do polihidroxibutirato, o polihidroxialcanoato diferente do polihidroxibutirato deve representar de 2 a 30% de massa total de polímeros formados.

11. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a

291003116

9103116

reivindicação 1, caracterizado por uma conversão onde para cada quilo de polímero formado devem ser consumidos, no máximo, 6 kg de açúcares, sendo que preferencialmente devem ser consumidos 3 kg de açúcares ou menos; em média, cada metro cúbico de fermentador deve produzir, em geral em uma hora, cinqüenta gramas de polímeros, podendo atingir uma produção média horária superior a 100 g de polímeros.

12. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as duas fases de fermentação poderem ser conduzidas em um mesmo tanque (3) ou tanques diferentes (3) e (4), caso em que ao final da primeira fase, fase de crescimento, se procede à concentração das células de bactérias através de uma operação de centrifugação ou filtração em separadores (5), resultando em um volume de operação da fase de acúmulo igual à metade do empregado na fase de crescimento, ou preferencialmente da ordem de 10% do volume da fase de crescimento.

13. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, durante as 2 fases da fermentação (2), (3) e (4), ser injetado ar comprimido nos tanques de fermentação de forma a assegurar o fornecimento de oxigênio para metabolismo

29100116

9103116

das bactérias; sendo que as vazões de ar empregadas são superiores a 0,1 v/v/m (volume de ar injetado/volume de mosto/minuto) e inferiores a 2v/v/m.

14. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os tanques de fermentação (2), (3) e (4) poderem apresentar uma relação de diâmetro/altura desde de 1:1 até 1:15; sendo que a agitação do mosto é assegurada pelo uso de passagens a motores elétricos ou, simplesmente, resulta da injeção de ar comprimido cuja pressão absoluta deve estar compreendida na faixa de 1 a 4 atmosferas.

15. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, ao final da fermentação o meio contendo a suspensão de bactérias ser aquecido até uma temperatura superior a 80°C e inferior a 140°C, através da injeção direta de vapor no tanque (4) que contém a suspensão ou através da passagem da suspensão por trocador de calor (15), sendo que o tempo de aquecimento pode variar de 1 minuto a 3 horas.

16. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açúcares Extraídos da Cana de Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ao final da fase de acumulo aquecer-se a suspensão bacteriana provocando a

291003116

9103116

desnaturação dos ácidos nucleicos que provoca a inativação das bactérias e dificulta o aumento da viscosidade do meio após a lise (rompimento) celular que pode eventualmente ser realizada através do processamento da suspensão bacteriana em equipamentos convencionais como homogeneizadores de alta pressão (7).

17. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açucares Extraídos da Cana de Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por empregar-se solventes específicos durante o processo de extração e purificação dos PHA que consiste em uma extração com solventes que solubilizam os polímeros, seguido de precipitação do poliéster utilizando-se um não solvente miscível ao meio sendo que a remoção de resíduos celulares e dos polímeros podem ser efetuadas através de separadores mecânicos que citamos como exemplos não limitantes, centrífugas ou filtros (6), (10) e (11).

18. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por os principais solventes que podem ser empregados para extração de PHA que citamos como exemplos não-limitantes serem: a piridina; os carbonatos cílicos; os hidrocarbonetos parcialmente halogenados como o clorofórmio; o diclorometano; o 1,1 dicloretano; o 1,1,2 tricloroetano; o 1,1,2,2 tetracloretano; o 1,2,3 tricloropropano e o

391003116

9103116

cloreto de metíleno, sendo que o peso do solvente de extração é, de preferência, 10 a 100 vezes superior ao peso das células secas; a quantidade de solvente deve ser tal que a concentração da solução extraída contenha de 0,5 a 20% de PHB em peso; e, a recuperação dos polihidroxialcanoatos pode ser obtida por evaporação direta do solvente, seguida pela precipitação do polímero através do uso de um agente insolubilizante ("salting out") miscível ao meio.

19. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por serem os não-solventes adequados à precipitação dos polímeros a mistura etanol/água, etanol, acetona metil-etyl-cetona, hexano e éter de petróleo, ou outro conveniente; sendo que uma vez separados por decantação, filtração ou centrifugação, ou outro meio conveniente, os grânulos de polímeros podem passar por lavagens sucessivas com metanol ou acetona, ou outra substância conveniente, para serem purificados, além do que os solventes e não-solventes são reciclados após um processo de destilação convencional de onde se elimina a água e eventuais contaminantes.

20. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, alternativamente, os

29103116

9103116

polihidroxialcanoatos, poderem ser extraídos e purificados por um processo enzimático, de forma que à suspensão de bactérias é adicionada uma mistura de enzimas comerciais, tais como proteases bacterianas ou fúngicas, papaina, bromelina, pepsina, lipases, fosfolipases, lisozima, enzimas líticas ou qualquer outro preparado enzimático, em qualquer proporção, capaz de digerir e solubilizar parte ou todo material celular a menos dos polihidroxialcanoatos, em uma ou mais etapas consecutivas; sendo que o preparado enzimático deve ser adicionado à suspensão de bactérias na proporção de 0,1 parte em massa de preparado para 100 partes de suspensão, podendo em alguns casos apresentar uma proporção mássica de até 10 partes de preparado para 100 partes de suspensão.

21. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açúcares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o preparado enzimático dever permanecer em contato com a suspensão das bactérias por um período maior do que 1 hora e inferior a 10 horas a uma temperatura compreendida na faixa de 30 a 80°C; sendo que, a digestão enzimática do material celular pode ser precedida de uma etapa de tratamento com uma agente surfactante, que citamos como exemplo não limitante o dodecil sulfato de sódio, ou até mesmo realizar conjuntamente um tratamento enzimático/surfactante; além do que, para algumas

391003116
9103115

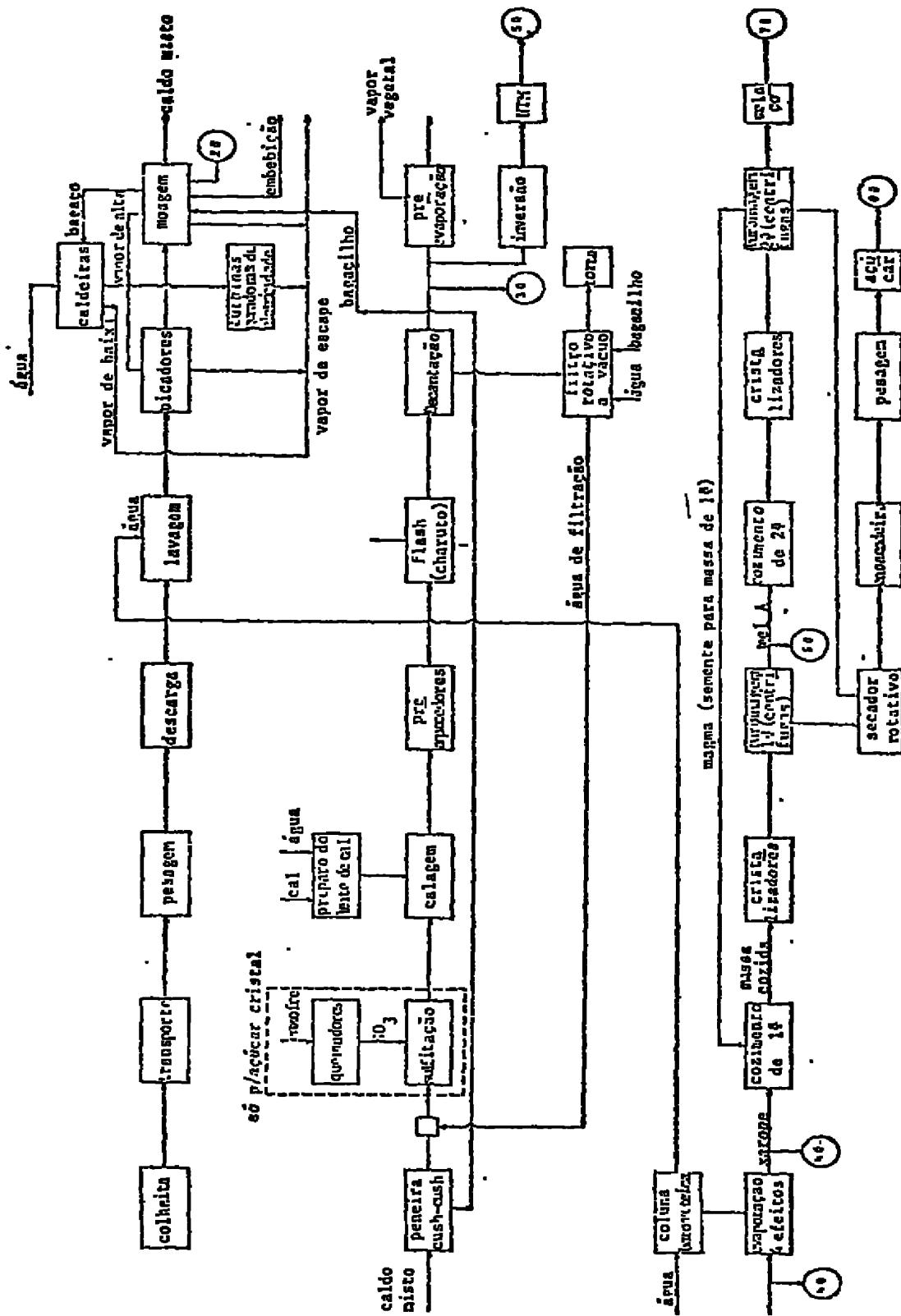
utilizações dos Polihidroxialcanoatos o tratamento pode ser feito apenas com o surfactante em condições equivalentes àquelas empregadas no processo de purificação enzimático.

22. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açucares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por qualquer que seja o processo de extração e purificação utilizar-se pelo menos 2 tanques agitados (8) e (9), com temperatura controlada através da recirculação externa dos fluidos em trocadores de calor (16) e (17).

23. "Processo para Produzir Polihidroxialcanoatos Microbianos a Partir de Açucares Extraídos da Cana-de-Açúcar", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilização de equipamentos convencionais na secagem dos grânulos os polímeros de PHA, preferencialmente do copolímero PHB/PHV, onde citamos como exemplo não limitante spray-driers ou ciclones (12).

9 1 0 3 1 1 6
139 100 100 100

Fig. 1



29100116
9103116

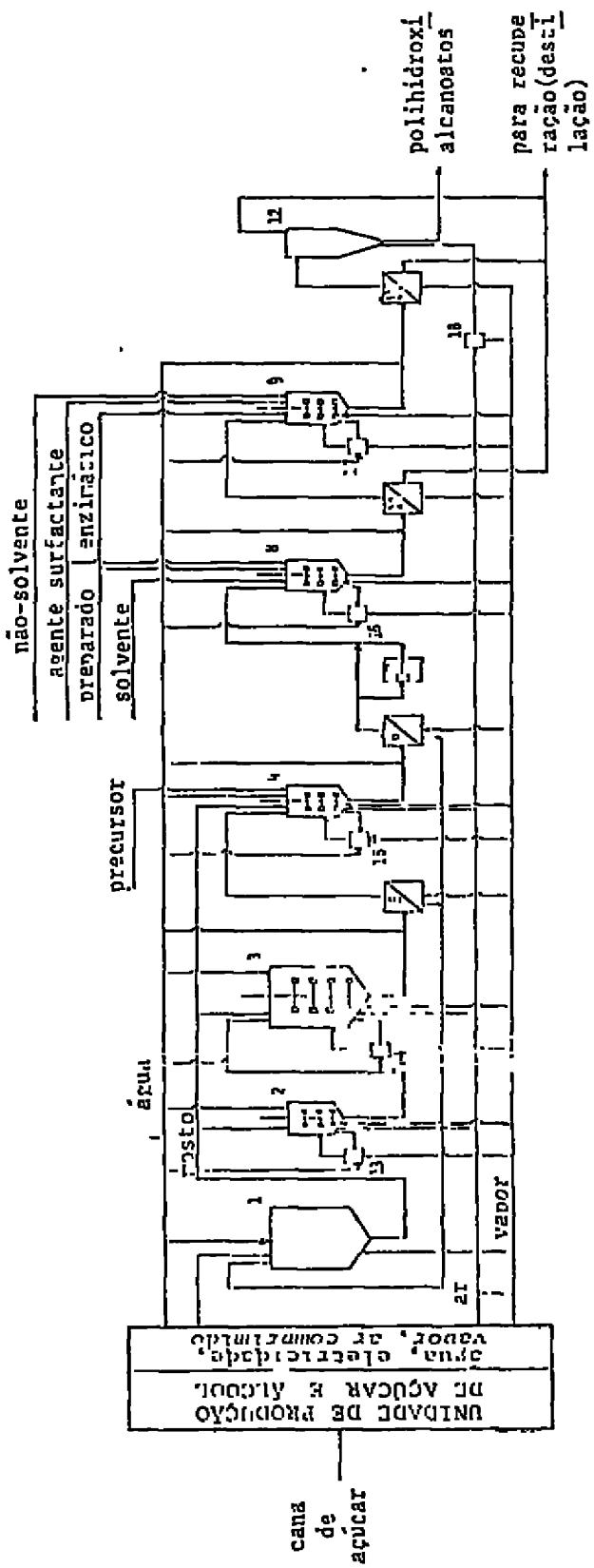


Fig. 2

9103116
29103116

RESUMO

PATENTE DE INVENÇÃO: "PROCESSO PARA PRODUZIR POLIHIDROXIALCANOATOS MICROBIANOS A PARTIR DE AÇUCARES EXTRAÍDOS DA CANA-DE-AÇUCAR"

Esta invenção trata de um processo de produção de polihidroxialcanoatos, designados genericamente como PHA, obtidos por fermentação submersa onde a principal, mas não única, fonte de carbono é constituída por açúcares extraídos da cana-de-açúcar em sua forma bruta como caldo, ou processada, como méis, xaropes, melações ou cristais com diversos graus de pureza que contenham misturas de sacarose, glicose e frutose em qualquer proporção. O processo de extração e preparo do mosto de fermentação para a produção de polihidroxialcanoatos deve estar, preferencialmente, associado a uma unidade de produção de açúcar e álcool da qual recebe não apenas a matéria-prima, mas também, toda a energia e demais utilidades necessárias. Os agentes biológicos responsáveis pela transformação destes açúcares em polihidroxialcanoatos são microrganismos procarionticos especialmente bactérias gram negativas usualmente

9103116
29103116

solos naturais preferencialmente pertencentes ao gênero **Alcaligenes**. O processo de fermentação é caracterizado pela existência de duas fases; uma primeira fase onde se emprega um meio rico em açúcares e nutrientes próprio para o crescimento das bactérias e uma segunda fase onde o meio deve apresentar uma carência nutricional preferencialmente em fontes de nitrogênio, capaz de direcionar o metabolismo das bactérias para a síntese e acúmulo de polihidroxialcanoatos. Nesta segunda fase além dos açúcares, devem estar presentes no meio de cultura outras fontes de carbono que atuem como precursores de polihidroxialcanoatos diferentes do polihidroxibutirato resultando, preferencialmente, na síntese do copolímero polihidroxibutirato/polihidroxivalerato. O processo de separação e purificação dos grânulos de polihidroxialcanoatos é baseado no uso combinado ou independente de solventes, não solventes, agentes surfactantes e preparados enzimáticos. As operações de separação e purificação podem ser precedidas pelo rompimento mecânico das células de bactérias e seguidas por uma operação de secagem dos grânulos.